

PENGARUH PENGGUNAAN FITASE AMOBIL *Bacillus subtilis* HG PADA JAGUNG TERHADAP BIOAVAILABILITAS Cu dan Mg**THE EFFECT OF USAGE IMMOBILIZED PHYTASE *Bacillus subtilis* HG IN CORN TO BIOAVAILABILITY OF Cu and Mg****Rahma Handi Himawani* dan Leny Yuanita**

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural science

State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, e-mail : r4hm4.h4nd1@gmail.com

Abstrak. Pada umumnya enzim fitase digunakan dalam bentuk enzim yang bebas dan hanya dapat digunakan satu kali, sehingga membuat biaya produksi enzim fitase menjadi mahal. Salah satu alternatif dari masalah ini adalah penggunaan fitase amobil karena dapat digunakan sampai beberapa kali pengulangan. Fitase amobil diperoleh dengan metode penjebakan menggunakan matriks alginat. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi mengenai pengaruh penggunaan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama dan keempat pada jagung terhadap bioavailabilitas Cu dan Mg. Fitase yang digunakan merupakan ekstrak kasar dari isolat *Bacillus subtilis* HG. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Post Test-Only Control Group Design. Tahapan penelitian: 1) analisis kadar fitat jagung dengan variasi bahan perendam jagung yaitu asam sitrat 9% (50 mL/50 gram jagung) selama 12 jam dan penambahan perendaman fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama dan keempat pada jagung selama 30 menit. P1 adalah jagung tanpa bahan perendam (kontrol), P2 perendaman dengan asam sitrat kemudian fitase amobil 1, dan P3 perendaman dengan asam sitrat kemudian fitase amobil 4, 2) bioavailabilitas Cu dan Mg. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anava satu arah ($\alpha = 0,05$). Hasil: 1) ada pengaruh penggunaan asam sitrat dengan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama dan keempat pada jagung terhadap kadar fitat jagung. Hasil kadar fitat berturut-turut adalah 11,386; 4,089; dan 6,526 (mg/g), 2) bioavailabilitas Cu dari P1, P2 dan P3 secara berturut-turut adalah 95,85%; 96,02%; dan 94,59%. Bioavailabilitas Mg dari P1, P2 dan P3 secara berturut-turut adalah 95,59%; 93,99%; dan 92,40%.

Kata kunci: alginat, fitase amobil, fitat, bioavailabilitas

Abstract. Generally the phytase enzyme was used in the free enzyme form and can be used only for one time, so it makes the cost of phytase enzyme production expensive. One of the alternative way to solve this problem is using immobilized phytase because it can be used repeatedly until many times. The immobilized phytase was made by trap method using alginate matrix. The purpose of this research is to get the information about the effect of usage the 1st and 4th immobilized phytase of *Bacillus subtilis* HG in corn to bioavailability of Cu and Mg. Phytase that used in this research is rough extract from *Bacillus subtilis* HG isolate. The research design is Post Test-Only Control Group Design. Phases of research: 1) analysis pytate concentration in corn with variation of soaking substance that was citric acid 9% (50 mL/50 gram corn) for 12 hours and additional of soaking the 1st and 4th immobilized phytase of *Bacillus subtilis* HG in corn for 30 minutes. P1 was corn without soaking substance (control), P2 was soaking by citric acid then the 1st immobilized phytase, and P3 was soaking by citric acid then the 4th immobilized phytase, 2) bioavailability of Cu dan Mg. The results were analized by One-way Anova ($\alpha = 0.05$). The

results : 1) there was the influence of the usage the citric acid with the 1st and 4th immobilized phytase of *Bacillus subtilis* HG in corn to the pytate concentration in corn. The pytate concentration was 11.386, 4.089, and 6.526 (mg/g), 2) Cu bioavailability of P1, P2, and P3 was 95.85%, 96.02%, and 94.59%. Mg bioavailability of P1, P2, and P3 was 95.59%, 93.99%, and 92.40%.

Keywords: alginate, immobilized phytase, phytate, bioavailability

PENDAHULUAN

Jagung merupakan makanan pokok yang bermanfaat bagi tubuh sebagai penyuplai energi. Jagung juga dapat memberikan nutrisi, vitamin, dan berbagai macam zat atau senyawa yang terkandung di dalamnya.

Pada makanan ternakpun sering menggunakan jagung sebagai suplai makanannya. Hal ini dikarenakan bahan pakan jagung dan dedak dapat digunakan sebagai bahan penyusun ransum, sumber energi, sumber karbohidrat dan dapat tersedia sepanjang tahun.

Pada tanaman jagung terkandung mineral yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan mineral yang terdapat pada jagung yaitu P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, dan Zn [1]. Pada jagung terdapat asam fitat sebesar 0.29% [2] yang merupakan senyawa antinutrisi, sehingga dapat berikatan dengan ion logam seperti Cu dan Mg.

Degradasi kadar fitat dalam jagung dapat dilakukan antara lain melalui perendaman (dengan beberapa pelarut seperti air dan asam-asam organik), pemanasan, perebusan, pengukusan, fermentasi, maupun melalui penambahan enzim fitase [3]. Degradasi fitat dapat dengan fitase, dimana akan membantu metabolisme zat makanan dalam hal penyerapan zat makanan.

Pada era sekarang penggunaan enzim fitase banyak digunakan dalam bentuk yang bebas sehingga penggunaannya hanya sekali. Fitase amobil digunakan sebagai alternatif untuk menghemat biaya. Fitase amobil dijerap dengan metode penjebaran dengan menggunakan matriks alginat. Natrium alginat merupakan alginat yang sudah diproduksi secara komersial. Natrium alginat merupakan garam dari asam alginat yang dapat larut dalam air.

Pada penelitian ini menggunakan fitase amobil pertama dan fitase amobil keempat pada perendaman jagung yang bertujuan untuk mendegradasi kadar fitat, dikarenakan masih adanya kestabilan enzim dan memiliki aktivitas enzim pada fitase amobil pertama dan fitase amobil keempat. Pada penelitian [4] diperoleh tingkat kestabilan antara asam fitat dengan beberapa mineral yaitu Cu>Zn>Mn>Mg>Co>Ni. Hal ini dapat membuat nilai cerna dan ketersediaan hayati akan menurun.

Enzim fitase mampu melepaskan ikatan fitat dengan Cu serta dapat meningkatkan relaksasi usus dan absorpsi nutrien [5]. Defisiensi tembaga dapat menyebabkan anemia dan menurunnya ketahanan tubuh terhadap penyakit. Ikatan fitat-Mg juga dapat terlepas dengan menggunakan fitase. Kekurangan magnesium akan menyebabkan *hypomagnesemia* dengan gejala denyut jantung tidak teratur. Berdasarkan penjelasan diatas, maka dilakukan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh penggunaan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pada jagung terhadap bioavailabilitas Cu dan Mg.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu : tahap I penentuan kadar fitat jagung dan tahap II bioavailabilitas Cu dan Mg. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anava satu arah ($\alpha=0.05$).

Alat:

Gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, vial, neraca, labu ukur, spatula, Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu-1700, *shaker*, *sentrifuge*,

penangas air, cawan porselen, cawan pengabuan, *furnace*, dan Spektrofotometer Serapan Atom Perkin Elmer.

Bahan:

Serbuk Fe, sampel tepung jagung lolos ayakan 100 mesh, HCl, TCA, FeCl₃, Na₂SO₄, aquades, hidrosilamin, *o*-phenantrolin, Na-asetat, NaOH, sampel (pakan dan feses), larutan 6 M HCl, larutan 0,1 M HNO₃, larutan 0,01% HNO₃, aquademin.

PROSEDUR PENELITIAN

Persiapan Sampel Jagung

Butiran jagung sebanyak 50 gram, dicuci bersih dengan aquademin. Selanjutnya jagung ditimbang, lalu diberi perlakuan : 1) perendaman jagung dengan aquademin (P1), 2) perendaman jagung menggunakan larutan asam sitrat 9% (50 mL/50 gram jagung) selama 12 jam dan penambahan perendaman fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pada jagung (fitase amobil pertama) 30 menit (P2), 3) perendaman jagung menggunakan larutan asam sitrat 9% (50 mL/50 gram jagung) selama 12 jam dan penambahan perendaman fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pada jagung (fitase amobil keempat) 30 menit (P3). Selanjutnya, dicuci bersih dengan aquades dan ditiriskan. Setelah cukup kering, dioven pada suhu 50-60°C sampai kering. Setelah itu, jagung dihaluskan dan diayak sampai lolos ayakan 100 mesh.

Penentuan Kadar Fitat

Penentuan kadar fitat dilakukan dengan menggunakan metode Metode Makower, dan Wheeler dan Farrel [6].

Penentuan Kadar Cu dan Mg pada Pakan dan Feses

Penentuan kadar Cu dan Mg pada pakan dan feses dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom Perkin Elmer [7].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada jurnal ini akan dibahas mengenai pengaruh penggunaan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG terhadap kadar fitat jagung, bioavailabilitas Cu dan bioavailabilitas Mg.

Kadar Fitat

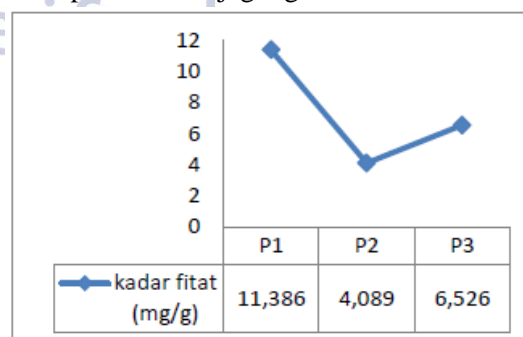
Sampel jagung yang telah diberi perlakuan penelitian, diuji kadar fitatnya dan hasilnya disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar Fitat (mg/g) pada Jagung dengan Variasi Bahan Perendam (Asam Sitrat kemudian penambahan Fitase Amobil *Bacillus subtilis* HG)

Perlakuan	Kadar Fitat (mg/g)
P1	11,386a
P2	4,089b
P3	6,526c
F= 53,597, p= 0,000	

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

Analisis statistik pada kadar fitat jagung pada tabel 1, diketahui bahwa data berdistribusi normal dan homogen, dan dengan ANOVA satu arah hasil analisis menunjukkan nilai signifikan kurang dari 0,05. Hal tersebut berarti bahwa ada pengaruh variasi bahan perendaman jagung berupa asam sitrat dengan penambahan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pada jagung (fitase amobil pertama) (P2) dan asam sitrat dengan penambahan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pada jagung (fitase amobil keempat) (P3) terhadap kadar fitat jagung.



Gambar 1. Grafik Pengaruh Variasi Bahan Perendaman Terhadap Kadar Fitat Jagung

Pada gambar 1, perendaman jagung dengan asam sitrat dan fitase amobil menghasilkan penurunan kadar fitat sebesar 4,089 mg/g. Hal tersebut dikarenakan asam sitrat memiliki gugus karboksil (COO-) dan gugus hidroksil (OH-) sehingga mampu mengkelat logam pada senyawa fitat [8].

Adanya kenaikan kadar fitat dari (P2) ke (P3) menandakan adanya pengaruh pengulangan perendaman fitase amobil didasarkan pada adanya daya katalitik dan stabilitas enzim yang akan berkurang karena pengulangan perendaman enzim amobil sehingga aktivitas enzim amobil menjadi menurun [9].

Fitase dapat menghidrolisis fitat pada C3 atau C6 dari bentuk mio-inositol heksakisfosfat menjadi bentuk lebih sederhana, yaitu: D-inositol(1,2,4,5,6)P5 menjadi inositol(2,4,5,6)P4 menjadi inositol(2,4,6)P3 atau inositol(2,4,5)P3 atau inositol(1,2,6)P3 dan akhirnya menjadi inositol-2-P, sehingga nutrisi yang terikat pada asam fitat terhidrolisis dan lepas dari ikatannya [10]. Pada penelitian [11] menyatakan bahwa melalui teknik enzimatik sangat mungkin terjadi degradasi sempurna terhadap fitat sereal maupun kacang-kacangan.

Bioavailabilitas Cu dan Mg

Bioavailabilitas Cu dan Mg adalah jumlah mineral (Cu dan Mg) dari pakan yang dapat diabsorpsi ke dalam tubuh [12], didapatkan dari selisih antara jumlah mineral (Cu dan Mg) pada pakan dengan mineral (Cu dan Mg) pada feses yang dikeluarkan. Penentuan bioavailabilitas tersebut diukur menggunakan AAS untuk mengetahui absorbansi pada pakan dan feses hewan coba. Untuk mengetahui kadarnya, dilakukan analisis pada sampel pakan dan feses *Mus musculus*. Pengukurannya dilakukan dengan menggunakan AAS, kemudian kadarnya akan dikonversi dengan jumlah pakan yang dikonsumsi dan feses yang dikeluarkan. Pada penelitian tahap 2 ini diperoleh persentase bioavailabilitas Cu yang disajikan pada tabel 2

dan persentase bioavailabilitas Mg disajikan pada tabel 3.

Tabel 2. Bioavailabilitas Cu pada *Mus musculus* dengan variasi kadar fitat pakan dari perbedaan perlakuan jagung

Perlakuan	Bioavailabilitas Cu (µg)	% Bioavailabilitas Cu
P1	2060,53	95,85a
P2	1810,89	96,02b
P3	1247,56	94,59c
F= 7,504, p= 0,023		

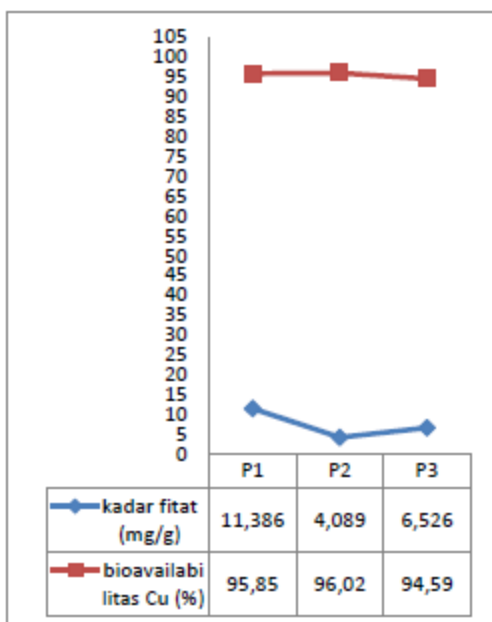
Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

Tabel 3. Bioavailabilitas Mg pada *Mus musculus* dengan variasi kadar fitat pakan dari perbedaan perlakuan jagung

Perlakuan	Bioavailabilitas Mg (µg)	% Bioavailabilitas Mg
P1	54970,74	95,59a
P2	29018,18	93,99b
P3	27351,52	92,40c
F= 60.323, p= 0.000		

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

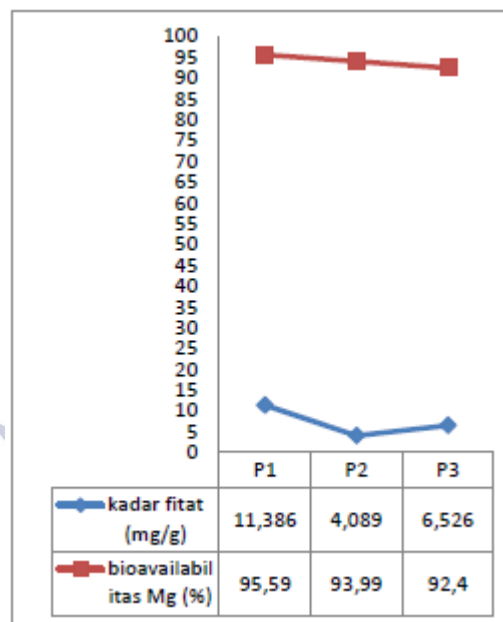
Analisis statistik pada kadar fitat jagung, diketahui bahwa data berdistribusi normal dan homogen, dan dengan ANOVA satu arah hasil analisis menunjukkan nilai signifikan kurang dari 0,05. Hal tersebut berarti bahwa ada pengaruh variasi bahan perendaman jagung terhadap bioavailabilitas Cu disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik hubungan antara variasi kadar fitat pada pakan terhadap bioavailabilitas Cu

Pada gambar 2 menunjukkan bahwa pada P2 menghasilkan persentase bioavailabilitas Cu sebesar 96,02% dengan kadar fitat sebesar 4,089 mg/g. Peningkatan absorpsi mineral Cu pada gambar 2, disebabkan ikatan fitat-Cu tidak terikat kuat saat mineral Mg, K, dan Ca sudah diikat oleh asam fitat sehingga Cu dapat diabsorpsi baik dalam usus.

Pada penelitian ini menggunakan asam sitrat dan fitase, dimana kombinasi asam sitrat dan fitase dapat mendegradasi fitat lebih banyak, sehingga dapat memudahkan Cu terabsorpsi dalam usus dan dapat mengurangi resiko anemia akibat defisiensi Cu dalam tubuh. Defisiensi Cu akan menyebabkan anemia dan menurunnya ketahanan tubuh terhadap penyakit. Hubungan antara variasi kadar fitat pada pakan terhadap bioavailabilitas Mg disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik hubungan antara variasi kadar fitat pada pakan terhadap bioavailabilitas Mg

Pada gambar 3, P2 menghasilkan persentase bioavailabilitas Mg sebesar 95,59% dengan kadar fitat sebesar 11,386 mg/g. Pada tabel 4.2 didapatkan bioavailabilitas Cu pada P1 sebesar 95,85% dan P2 sebesar 96,02%, hal ini dikarenakan masih adanya aktivitas fitase terhadap bioavailabilitas Cu dalam usus.

Bioavailabilitas Mg lebih rendah dibandingkan dengan Cu pada gambar 2 dan 3 dikarenakan pada penelitian ini ikatan fitat-Mg membentuk garam yang sukar larut. Pada penelitian [13] asam fitat dapat membentuk ikatan baik dengan mineral Mg sehingga ikatan fitat-Mg ini akan sukar larut dalam air.

Pada tabel 4.3 didapatkan nilai bioavailabilitas Mg pada P1 lebih tinggi daripada P3. Hal ini dimungkinkan fitase amobil 4 sudah tidak berperan, sehingga pencernaan hewan coba terganggu karena memakan pakan yang terdapat fitase amobil 4 dan mengganggu absorpsi dalam usus. Selain itu, zat-zat mungkin hilang saat pembilasan berulang-kali pada pakan sehingga absorpsi tidak berjalan baik pada P3 dibandingkan pada kontrol.

Rendahnya bioavailabilitas Mg dipengaruhi oleh faktor interaksi mineral Mg dengan mineral Cu. keberadaan mineral Cu dan Mg secara bersamaan akan membuat absorpsi magnesium rendah dikarenakan gugus fosfat pada asam fitat memiliki afinitas lebih tinggi terhadap proton Cu, sehingga ikatan fitat-Cu tidak terikat kuat saat mineral Mg sudah diikat oleh asam fitat dan Cu dapat diabsorpsi baik dalam usus [14].

Selain itu, pada saat bersamaan terjadi juga persaingan dengan mineral lain, penambahan fitase amobil 1 membuat absorpsi mineral Fe dan Ca meningkat dan menurunkan absorpsi mineral Mg, seperti yang terdapat pada penelitian [15] menyatakan bahwa didapatkan peningkatan hasil bioavailabilitas Fe dengan persentase perendaman fitase amobil pertama sebesar 97,888%, serta didapatkan peningkatan bioavailabilitas Ca dengan persentase perendaman fitase amobil pertama sebesar 93,134%. Oleh karena itu, absorpsi Mg akan kalah akibat persaingan antar mineral Fe dan Ca dalam usus.

Perendaman jagung dengan fitase amobil yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan fitase amobil pertama dan keempat. Hal ini didukung dengan penelitian [16] yang menyatakan bahwa fitase amobil dari *Bacillus pumilus* SAF1 memiliki aktivitas maksimum saat dijemak dengan Na-alginat.

Berdasarkan hasil penelitian tahap 2, maka dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh penggunaan asam sitrat dengan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama pada jagung terhadap bioavailabilitas Cu hewan coba.

SIMPULAN

1. Ada pengaruh penggunaan asam sitrat dengan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama dan keempat pada jagung terhadap kadar fitat jagung. Kadar fitat terendah diperoleh pada P2 yaitu sebesar 4,089 mg/g.

2. Ada pengaruh penggunaan asam sitrat dengan fitase amobil *Bacillus subtilis* HG pertama pada jagung terhadap bioavailabilitas Cu hewan coba sebesar 96,02%.

SARAN

Disarankan perlu dilakukan penelitian mengenai bioavailabilitas mineral lain selain Cu dan Mg, misalnya Co, Mn dan Ni.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bressani, R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev. Int.* 6: 225-264.
2. Sari, Meisji Liana dan F. Gurki N Ginting. 2012. Pengaruh Penambahan Enzim Fitase Pada Ransum terhadap Berat Relatif Organ Pencernaan Ayam Broiler. *Agripet* 12(2): 37-41. Palembang: Universitas Sriwijaya.
3. Mulyati, Tri Ana. 2011. Pengaruh Variasi Lama Perendaman Dan Konsentrasi Asam Sitrat Dengan Penambahan Enzim Fitase Pada Jagung (*Zea Mays* L) Terhadap Bioavailabilitas Mineral Zn (In-Vitro). *Skripsi* yang tidak dipublikasikan. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
4. Evans WJ, Martin CJ. 1988. Interactions of Mg(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) with phytic acid.8. A Calorimetric Study. *J Inorg Biochem*; 32: 259-68.
5. Traylor SL, Cromwell GL, Lindermann MD, Kuabe DA. 2001. Effects of Levels of Supplemental Phytase on Ileal Digestibility of Amino Acid. *company.Inc. London*.
6. Sudarmadji, S., Bambang H., Suhardi. 2007. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
7. AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis 13th ed.* Washington, D.C: Assn. of Official Analytical Chemists.
8. Ismangil dan Eko Hanudin. 2005. Degradasi Mineral Batuan oleh Asam-Asam

- Organik. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* Vol 5 (1): 1-17.
9. Firman, S. 2005. Amobilisasi Enzim Penisilin Asilase Dari E.Coli B1O4 Dengan Poliakrilamida. *Jurnal Penelitian, Medan*. Vol.17.
10. Kerovuuo, Janne, Juha Rouvinen and Frank Hatzack. 2000. Analysis of Myo-Inositol Hexakisphosphate Hydrolysis by Bacillus Phytase : Indication of A Novel Reaction Mechanism. *Biochemistry Journal* 352 : 623-628.
11. Yuanita, Leny dkk.. 2010. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Fitase Bacillus subtilis Dari Holiwood Gresik. *Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya*.
12. Palupi, NS, FR Zakaria dan E Prangdimurti. 2007. *Evaluasi Nilai Biologis Vitamin dan Mineral*. Bogor: IPB Press.
13. Wylis, R.A.dkk. 2011. Penurunan Kadar Asam Fitat Tepung Jagung Selama Proses Fermentasi Menggunakan Ragi Tape. *Seminar Nasional Serealia. Lampung*.
14. Yanfang Pang And Todd J. Applegate. 2006. Effects of Copper Source and Concentration on in Vitro Phytate Phosphorus Hydrolysis by Phytase. *J. Agric. Food Chem.*, 1792–1796.
15. Yuanita, Leny dkk.. 2013. Pemanfaatan Fitase Bacillus Subtilis Holiwood Gresik Amobil Untuk Meningkatkan Nilai Gizi Pada Tepung Jagung Bebas Fitat. *Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya*. Vol 2 No.1
16. Hasan,F., Samiullah.K ., Aamer.A ., and Abdul Hameed. 2009. Production Of Antibacterial Compounds By Free And Immobilized *Bacillus Pumilus* SAF1. *Department of Microbiology, Pakistan*.

